



特 許 願

昭和47年8月4日

特許庁長官 三宅幸夫 殿

1. 発明の名称 ハツコウホウ 発酵法による L-メチオニンの製造法 セイゾウホウ

2. 発明者

住 所 カンザンサイワイクオウ 神奈川県川崎市幸区小倉 1060  
氏 名 ナカモリ 中 森 茂 シヤウ

3. 特許出願人

郵便番号 104  
住 所 東京都中央区京橋1丁目6番地  
電話番号 東京(03)272-1111番(代表)  
名 称 (004) 味の素株式会社  
代表者 取締役社長 鈴木 恭 二

4. 添付書類の目録

(1) 明 細 書 1 通

47 078237

## 明 細 書

1. 発明の名称 発酵法による L-メチオニンの製造法

2. 特許請求の範囲

プレビaktetリウム属に属し、L-メチオニン生産能を有する細菌を栄養培地に培養し、生成した L-メチオニンを採取することを特徴とする発酵法による L-メチオニンの製造法。

3. 発明の詳細な説明

この発明はプレビaktetリウム属に属する細菌で培地中に L-メチオニンを生成蓄積する菌株を培養し、L-メチオニンを単離回収して製造する方法に関するものである。L-メチオニンは現在までもつばら合成法で製造されている。微生物が L-メチオニンを培地中に分泌する例としては、大腸菌、サルモネラ等のエチオニン、α-メチルメチオニン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシミン等の耐性株について知ら

① 日本国特許庁

## 公開特許公報

① 特開昭 49 - 35580

④ 公開日 昭49.(1974) 4. 2

② 特願昭 47-78237

② 出願日 昭47.(1972) 8. 4

審査請求 未請求 (全3頁)

庁内整理番号

⑤ 日本分類

7025 49

36(2)D251

れているが、その量については明示されていない。発明者らは発酵法による L-メチオニンの製造法について検討した結果、プレビaktetリウムに属する細菌でメチオニンのアナログであるエチオニンに耐性を示す菌株の中には培地中に L-メチオニンを蓄積するものが多く存在することを発見しこの発明を完成した。

この発明において使用される菌株はプレビaktetリウムに属するもの(バーgerのマニュアルオブゲタミネイティブaktetリオロジイ、オ7版により決定)で、メチオニンのアナログであるエチオニンによつて生育阻害を受けないエチオニン耐性株である。またエチオニン耐性以外にさらに他の薬剤耐性あるいは栄養要求性等を付与することも L-メチオニンの生産性を上げる目的で有利である。本発明に使用される代表的な菌株としてはプレビaktetリウム・フラバム E-332、TE-100 等があり、このうち TE-100 はエチオニン耐性、スレオニン要求性株である。プレビaktetリウム・フラ

バム E-332 は工業技術院発酵研究所に微工  
研審審オ / 542 号として寄託されている。

この発明に使用されるエチオニン耐性株、  
プレバクテリウム・フラバム E-332 と感受  
性株プレバクテリウム・フラバム E-2247  
の両者についてエチオニン含有培地での生育の  
変化を調べたところ表-1 のような結果であつた。

表-1 の結果から明らかなようにエチオニンの  
濃度が高くなるにつれて感受性株の生育が阻害  
されるのに対して耐性株では無添加の場合とほ  
んど変わらない生育が見られた。

表-1

DL-エチオニン(mg/ml)	相 対 生 育 度 (%)	
	プレバクテリウム・ フラバム E-2247	プレバクテリウム・ フラバム E-332
0	100	100
0.25	84	97
0.50	16	101
1.0	15	98
2.5	10	85

サイアミン(1塩酸塩) 10  $\mu$ g

微量金属液 0.1 ml

※微量金属液

1 liter 当たり含有量

硝酸ソーダ 50mg

モリブデン酸  
アンモニウム 57mg

塩化ナトリウム 970mg

硫酸亜鉛 8800mg

塩化マンガン 72mg

この発明におけるエチオニン耐性株とは上記  
の最少培地に DL-エチオニン 0.5 mg/ml とする  
ように添加した培地での 24 時間後の生育が無  
添加時の 50% 以上の菌株と定義する。

L-メチオニンの生産のための培地は特に制  
限するところはなく、通常の菌の生育が見られ  
る条件がかなっている。すなわち炭素源として  
はグルコース、サルトース、フラクトース、で  
んぷん、あるいはセルロース等の加水分解物、  
腐植質等の炭水化物、酢酸、クエン酸等の有機

(注)

上の結果は試験管に分注した下記組成のメチ  
オニンを含む最少培地 5 ml に DL-エチ  
オニン(シグマ社製)を規定の濃度添加した  
培地を作り、それぞれに、ペプトン 1%, 酵  
母エキス 1%, NaCl 0.5%, グルコース 0.5  
%を含む培地で 30℃、16 時間培養した菌  
体を集め、0.1M リン酸緩衝液で洗浄後、菌  
濃度が約  $10^7$ /ml となるように種えつけ 30  
℃、24 時間振盪培養した後の生育度を比較  
したものである。

最少培地組成 水 100 ml 当たり添加量

グルコース	0.5 %
硫 安	0.15 %
リン酸 1 カリウム	0.10 %
リン酸 2 カリウム	0.30 %
尿 素	0.15 %
硫酸マグネシウム(7水塩)	0.01 %
塩化カルシウム(2水塩)	0.0001 %
ビ オ チ ン	5 $\mu$ g

酸類、エタノール、グリセリン等のアルコール  
類等が使用される。窒素源としては硫安、尿素、  
硝安、塩化アンモン、リン酸アンモン、アンモ  
ニア水等が、無機物としてはマグネシウム、カ  
ルシウム、鉄、マンガン等、栄養要求性のある  
場合はアミノ酸、核酸、ビタミン等を加え、必  
要に応じて生育促進のために酵母エキス、カゼ  
イン加水分解物、大豆の加水分解物等を加える。  
さらにメチオニンを構成する硫黄を供給するた  
めに通商を硫黄化合物を添加すると好結果がえ  
られる。

培養条件は通常の方法で pH 5~9、温度  
20~40℃、で振盪または通気攪拌する。培  
養中に pH が低下する場合は、炭酸カルシウム  
を別殺菌して加えるか、アンモニアで中和する。  
有機酸を炭素源とする場合は培養中に pH が上  
昇するので、有機酸または核酸を加えて中和す  
る。24~72 時間培養を行なうと L-メチオ  
ニンが培地中に蓄積される。

L-メチオニンの単離は微細晶析、イオン交

換菌処理等の方法により行なう。その粗製結晶については、ペーパークロマトグラム上のRf値、電気泳動の移動度、微生物定量法による生物活性値によりL-メチオニンの精製と一致することを確認した。L-メチオニンの定量はロイコノスト・クローゼンアロイデス(ATCC 8042)による微生物定量法によつて行なつた。

## 実施例1

表-2に示したL-メチオニン生産用培地20mlを用つきフラスコに分注し、これにプレバクテリウム・フラバムT<sub>8</sub>-532を接種し、30℃、66時間振盪培養し、0.41g/literのL-メチオニンが蓄積した。

表-2 1liter当り含有量

グルコース	100 g
硫酸アンモニウム	50 g
リン酸カリウム	1.5 g
硫酸マグネシウム(7水)	0.4 g
ビオチン	200 µg

ナイアシン	500 µg
Fe	2 ppm
Mn	2 ppm
酵素(大豆加水分解物)	4 ml
炭酸カルシウム	50 g

## 実施例2

表-2に記載の培地にL-スレオニンを1mg/mlとなるように添加した培地にプレバクテリウム・フラバムT<sub>8</sub>-100を実施例1と同様に培養し、0.49g/literのL-メチオニンが蓄積した。

## 実施例3

実施例2で用いる培地にD-メチルシステインを2.5g/mlとなるように添加した培地にプレバクテリウム・フラバムT<sub>8</sub>-100を実施例1と同様に培養し1.51g/literのL-メチオニンが蓄積された。

特許出願人 味の素株式会社

(1) 願書副本 1通

## 5.前記以外の発明者

住 所 カマフラシマス  
神奈川県鎌倉市佐助1-16-19  
氏 名 シ・イ・オ イヤム  
椎 尾 男

住 所 マイダシマス  
東京都町田市玉川学園8-21-2  
氏 名 サノ コウノスケ  
佐 野 孝之輔